



УКРАЇНА

(19) UA (11) 82286 (13) C2

(51) МПК

C07C 255/54 (2006.01)

A61K 31/277 (2006.01)

A61P 5/28 (2006.01)

A61P 17/14 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) МОДУЛЯТОРИ АНДРОГЕНОВОГО РЕЦЕПТОРА

1

2

(21) а200608990

(22) 31.01.2005

(24) 25.03.2008

(86) PCT/IB2005/000229, 31.01.2005

(31) 60/544,738

(32) 13.02.2004

(33) US

(31) 60/605,647

(32) 30.08.2004

(33) US

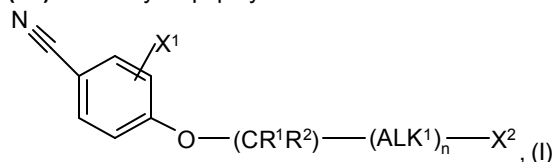
(46) 25.03.2008, Бюл.№ 6, 2008 рік

(72) ХУ ЛЕЙН-ЄН, ЛЕЙ ХУАНГШУ, САУС, ДУ
ДАНИЕЛ ЮНЛОНГ, ЛЕФКЕР БРЮС АЛЛЕН

(73) УОРНЕР-ЛАМБЕРТ КОМПАНІ ЛЛС

(56) WO 99/08673 A
DE 10218963 A1

(57) 1. Сполука формули:



пролікарська форма згаданої сполуки, гідрат згаданої сполуки або фармацевтично прийнятна сіль згаданої сполуки, в якій:

X¹ являє собою галоген або галоалкіл;

X² являє собою -CR³R⁴R⁵, -CH=CH₂ або -C≡CH;

R¹ і R² є кожен, незалежно, замісником, що вибирають з групи, яка містить водень, галоген, C₁-₆ алкіл, галоалкіл, гідроксіалкіл, тіол і тіоалкіл;

R³, R⁴, і R⁵ є кожен, незалежно, замісником, що вибирають з групи, яка містить водень, галоген, C₁-₆ алкіл, галоалкіл, гідрокси, гідроксіалкіл, тіол, тіоалкіл і -NR⁶R⁷;

n представляє 0 або 1;

ALK¹ являє собою C₁-₈ лінійну алкіленову групу, в якій до 8 атомів водню алкіленової групи можуть бути замінені замісником, що вибирають з групи, яка містить C₁-₆ алкіл, галоалкіл, галоген, гідрокси, гідроксіалкіл, тіол, тіоалкіл і -NR⁶R⁷;

R⁶ і R⁷ є кожен, незалежно, водень або C₁-₆ алкіл; за умови, що:

1) якщо n є 0 і X² являє собою -CH=CH₂ або -C≡CH, тоді принаймні один з R¹ або R² являє собою тіол, гідроксіалкіл або тіоалкіл;

2) якщо n є 1 і X² являє собою -CH=CH₂ або -C≡CH, тоді, як альтернатива, принаймні один з R¹ або R² є замісником, що вибирають з групи, яка містить тіол, гідроксіалкіл і тіоалкіл, або принаймні один атом водню Alk¹ замінений замісником, що вибирають з групи, яка містить гідрокси, тіол, гідроксіалкіл і тіоалкіл;

3) якщо n є 0 і X² являє собою -CR³R⁴R⁵, тоді, як альтернатива, принаймні один з R¹ або R² є замісником, що вибирають з групи, яка містить тіол, гідроксіалкіл і тіоалкіл, або принаймні один з R³, R⁴ або R⁵ являє собою гідрокси, гідроксіалкіл, тіол або тіоалкіл;

4) якщо n є 1 і X² являє собою -CR³R⁴R⁵, тоді, як альтернатива: а) принаймні один з R¹ або R² є замісником, що вибирають з групи, яка містить тіол, гідроксіалкіл і тіоалкіл, б) принаймні один з R³, R⁴ або R⁵ являє собою замісник, що вибирають з групи, яка містить гідрокси, гідроксіалкіл, тіол і тіоалкіл, або с) принаймні один атом водню Alk¹ замінений замісником, що вибирають з групи, яка містить гідрокси, тіол, тіоалкіл і гідроксіалкіл.

2. Сполука згідно з пунктом 1, в якій n є 0 і принаймні один з R¹, R², R³, R⁴, R⁵ являє собою C₁-₆ алкіл, галоалкіл, гідроксіалкіл і тіоалкіл.

3. Сполука згідно з пунктом 1, в якій n є 1 і принаймні один атом водню Alk¹ замінений замісником, що вибирають з групи, яка містить C₁-₆ алкіл, галоалкіл, гідроксіалкіл і тіоалкіл, або один з R¹, R², R³, R⁴, R⁵ являє собою C₁-₆ алкіл, галоалкіл, гідроксіалкіл і тіоалкіл.

4. Сполука згідно з пунктом 1, 2 або 3, в якій X₁ є CF₃ і розташований в 2-положенні фенільного кільця.

5. Сполука згідно з пунктом 1, 2, 3 або 4, в якій X² є CR³R⁴R⁵, в якій принаймні один з R³, R⁴ або R⁵ є гідрокси або гідроксіалкілом.

6. Сполука згідно з пунктом 5, в якій принаймні один з R³, R⁴ або R⁵ є метилом.

7. Сполука згідно з пунктом 1, де згадану сполуку вибирають з групи, яка містить:

(13) C2

(11) 82286

(19) UA

(1S,2S)-4-(2-гідрокси-1-метилпропокси)-2-трифторметилбензонітрил;
 (1S,2S)-4-(2-гідрокси-1-метилпропокси)-2-трифторметилбензонітрил;
 4-(2-гідрокси-1-метилпропокси)-2-трифторметилбензонітрил;
 4-(2-гідрокси-6-метилгептилокси)-2-трифторметилбензонітрил;
 4-(2-гідроксиоктилокси)-2-трифторметилбензонітрил;
 4-(2-гідроксиокт-7-енілокси)-2-трифторметилбензонітрил;
 4-(3-гідроксибутокс)-2-трифторметилбензонітрил;
 (3S)-4-(3-гідроксибутокс)-2-трифторметилбензонітрил;
 4-(3-гідрокси-2-метилбутокс)-2-трифторметилбензонітрил;
 4-(3-гідрокси-2, 2-диметилпропокси)-2-трифторметилбензонітрил;
 4-(3-гідрокси-3-метилбутокс)-2-трифторметилбензонітрил;
 4-(3-гідрокси-2,2,4-триметилпентилокси)-2-трифторметилбензонітрил;
 4-(2-етил-3-гідроксигексилокси)-2-трифторметилбензонітрил;
 4-[2-(1-гідроксietил)гексилокси]-2-трифторметилбензонітрил;
 (1S,3S)-4-(3-гідрокси-1-метилбутокс)-2-трифторметилбензонітрил;
 (1R,3R)-4-(3-гідрокси-1-метилбутокс)-2-трифторметилбензонітрил;
 4-(4-гідроксибутокс)-2-трифторметилбензонітрил;
 4-(4-гідроксибутокс)-2-трифторметилбензонітрил;
 4-(4-гідроксигептилокси)-2-трифторметилбензонітрил;
 4-(4-гідрокси-1-пропілбутокс)-2-трифторметилбензонітрил;
 4-(4-гідрокси-1-метилпентилокси)-2-трифторметилбензонітрил;
 (1R,4R)-4-(4-гідрокси-1-метилпентилокси)-2-трифторметилбензонітрил;
 (1S,4S)-4-(4-гідрокси-1-метилпентилокси)-2-трифторметилбензонітрил

4-(5-гідроксипентилокси)-2-трифторметилбензонітрил;
 4-(5-гідроксигексилокси)-2-трифторметилбензонітрил;
 4-(5-гідрокси-3-метилпентилокси)-2-трифторметилбензонітрил;
 2-хлор-4-(3-гідрокси-2,2,4-триметилпентилокси)бензонітрил;
 2-хлор-4-(4-гідроксибутокс)бензонітрил;
 2-хлор-4-(3-гідроксипропокси)бензонітрил;
 2-хлор-4-(1-гідроксиметилалілокси)бензонітрил;
 2-хлор-4-(3-гідрокси-2-метилпропокси)бензонітрил;
 2-хлор-4-(5-гідрокси-пентилокси)бензонітрил;
 2-хлор-4-(4-гідрокси-1-метилпентилокси)бензонітрил і
 2-хлор-4-(5-гідрокси-3-метилпентилокси)бензонітрил.
 8. (1S,4S)-4-(4-гідрокси-1-метилпентилокси)-2-трифторметилбензонітрил або його фармацевтично прийнятна сіль.
 9. Застосування сполуки згідно з будь-яким з пунктів 1-8 як медикаменту.
 10. Застосування сполуки згідно з будь-яким з пунктів 1-8 при виробництві медикаменту для модулювання активності андрогенового рецептора.
 11. Застосування сполуки згідно з будь-яким з пунктів 1-8 при виробництві місцевого медикаменту для лікування андрогенетичної алопеції, надлишку шкірного сала або акне.
 12. Фармацевтична композиція, що містить сполуку згідно з будь-яким з пунктів 1-8, у поєднанні з 1 або декількома фармацевтично прийнятними екціпієнтами.
 13. Місцева фармацевтична рецептура, що містить сполуку згідно з будь-яким з пунктів 1-8, у поєднанні з 1 або декількома фармацевтично прийнятними екціпієнтами придатними для дермального застосування.
 14. Виріб, що містить сполуку згідно з будь-яким з пунктів 1-8, упакований для роздрібної торгівлі, який має інструкцію для покупця по використанню сполуки для полегшення стану, що вибирають з групи, яка містить акне, алопецію і жирну шкіру.

Представлений винахід стосується нового класу бензонітрилів і їх застосування як модуляторів андрогенового рецептора. Інші аспекти винаходу стосуються місцевого застосування цих сполук для полегшення алопеції і жирної шкіри.

Алопеція, або облісіння, є загальною проблемою, яку медична наука не вилікувала. Фізіологічний механізм завдяки якому відбувається випадіння волосся невідомий. Однак, відомо, що ріст волосся змінюється у осіб, що страждають на алопецію.

Волоссяні фолікули зазнають циклічної активності, що включає періоди росту, відпочинку і випадіння. Шкіра голови людини типово містить від 100000 до 350000 волосин, які зазнають перетворень на трьох окремих стадіях:

(а) під час фази росту (анаген) фолікул (тобто, корінь волоса) проникає глибоко в дерміс з швидким діленням клітин фолікули і диференціації в процесі синтезування кератину, домінуючого компоненту волосся. У людей, що не лисіють, ця фаза росту завершується протягом від одного до п'яти років;

(б) проміжна фаза (катаген) відзначається зупинкою мітозу і завершується за два-сім тижнів, і;

(в) фаза спокою (телоген), на якій волосся залишається на шкірі голови до 12 тижнів, до його заміни новим фолікулом, що росте знизу.

У людей, цей цикл росту не синхронізований. Людина має тисячі фолікул на кожній з цих трьох фаз. Однак, більшість волоссяних фолікул перебувають на анагенній фазі. У здорових

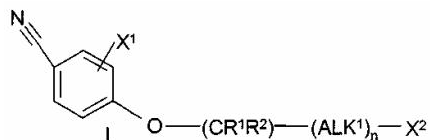
дорослих молодих людей, співвідношення аногенної фази до телогенної може бути вище за 9 до 1. До осіб з алопецією, це співвідношення може зменшуватись до позначки менше 2:1.

Андрогенетична алопеція виникає внаслідок активації успадкованої чутливості до андрогенних гормонів. Вона є найбільш загальним типом алопеції. Вона вражає і чоловіків (50%) і жінок (30%), спочатку людей європейської раси. З часом і з збільшенням віку відбуваються поступові зміни в діаметрі і довжині ствола волосся. Довге волосся поступово перетворюється на коротке, тонке, безбарвне волосся. Як наслідок, 20 річні чоловіки і 30-40 річні жінки починають відмічати, що їх волосся стає тоншим і коротшим. У чоловіків, найбільша втрата волосся відбувається на лобній частині і маківці голови. Жінки спостерігають потоншення волосся по всій шкірі голови. Як описано вище, співвідношення анагену до телогену значно зменшується, що призводить до меншого росту волосся.

Міноксидил, відкривач калієвого каналу, промотує ріст волосся. Міноксидил є комерційно доступним у сполучених штатах під торговою назвою ROGAINE®. В той час як чіткий механізм дії міноксидилу невідомий, його вплив на цикл росту волосся є добре задокументованим. Міноксидил промотує ріст фолікул волосся і збільшує час протягом якого фолікули волосся знаходяться в анагенній фазі (тобто, збільшують співвідношення анагену до телогену).

Поряд з тим, що міноксидил промотує ріст волосся, косметична ефективність цього росту може бути дуже широкою. Наприклад, Роенік описав результати клінічного дослідження, що включало 83 чоловіків, які використовували місцевий розчин 3% міноксидилу протягом 19 місяців. Ріст волосся відбувався у 55% суб'єктів. Однак, тільки 20% суб'єктів вважали ріст відповідним з косметичної точки зору. [Clin.Res., 33, No.4, 914A, 1985]. Тості повідомив про косметично прийнятний ріст у 18,1% його піддослідних. [Dermatologica, 173, No.3, 136-138, 1986]. Таким чином, існує потреба в сполуках, що мають здатність викликати високу швидкість косметично прийнятного росту волосся у пацієнтів з алопецією.

У відповідності з представленим винаходом, був відкритий новий клас 4-оксобензонітрилів. Ці сполуки і їх фармацевтично прийнятні солі, гідрати і їх проліки, можуть бути представлені наступною формулою:



в якій:

X^1 представляє собою галоген або галоалкіл;

X^2 представляє собою $-CR^3R^4R^5$, $-CH=CH_2$ або $-C\equiv CH$;

R^1 і R^2 є кожен, незалежно, замісником, що вибирають з групи, яка містить водень, галоген, C_{1-6} алкіл, галоалкіл, гідроксиалкіл, тіол і тіоалкіл;

R^3 , R^4 , і R^5 є кожен, незалежно, замісником, що вибирають з групи, яка містить водень, галоген, C_{1-6} алкіл, галоалкіл, гідрокси, гідроксиалкіл, тіол, тіоалкіл і $-NR^6R^7$;

n представляє собою ціле число 0 або 1;

ALK^1 представляє собою C_{1-8} лінійну алкіленову групу, в якій до 8 атомів водню алкіленової групи можуть бути замінені замісником, що вибирають з групи, яка містить C_{1-6} алкіл, галоалкіл, галоген, гідрокси, гідроксиалкіл, тіол, тіоалкіл і $-NR^6R^7$;

R^6 і R^7 є кожен, незалежно, водень або C_{1-6} алкіл

за умови, що:

1) якщо $n \in 0$ і X^2 представляє собою $-CH=CH_2$ або $-C\equiv CH$, тоді, принаймні, один з R^1 або R^2 представляє собою тіол, гідроксиалкіл або тіоалкіл;

2) якщо $n \in 1$ і X^2 представляє собою $-CH=CH_2$ або $-C\equiv CH$, тоді як альтернатива, принаймні, один з R^1 або R^2 є замісником, що вибирають з групи, яка містить тіол, гідроксиалкіл і тіоалкіл, або принаймні один атом водню Alk^1 замінений замісником, що вибирають з групи, яка містить гідрокси, тіол, гідроксиалкіл і тіоалкіл;

3) якщо $n \in 0$ і X^2 представляє собою $-CR^3R^4R^5$, тоді як альтернатива, принаймні один з R^1 або R^2 є замісником, що вибирають з групи, яка містить тіол, гідроксиалкіл і тіоалкіл, або принаймні один з R^3 , R^4 або R^5 представляє собою гідрокси, гідроксиалкіл, тіол, або тіоалкіл;

4) якщо $n \in 1$ і X^2 представляє собою $-CR^3R^4R^5$, тоді як альтернатива: а) принаймні один з R^1 або R^2 є замісником, що вибирають з групи, яка містить тіол, гідроксиалкіл і тіоалкіл, б) принаймні один з R^3 , R^4 або R^5 представляє собою замісник, що вибирають з групи, яка містить гідрокси, гідроксиалкіл, тіол і тіоалкіл, або с) принаймні один атом водню Alk^1 замінений замісником, що вибирають з групи, яка містить гідрокси, тіол, тіоалкіл, і гідроксиалкіл.

Сполуки формули I є модуляторами андрогенового рецептора. Сполуки мають спорідненість до андрогенового рецептора і їх біологічна дія буде обумовлена зв'язуванням рецептора. Типово, сполуки будуть діяти як антагоністи. У вибраних втіленнях вони будуть діяти як часткові агоністи, повні агоністи або тканиноселективні агоністи. Як модулятори андрогенового рецептора, сполуки можуть бути використані при лікуванні або полегшенні станів пов'язаних з недоречною активацією андрогенового рецептора. Прикладами таких станів для антагоністів є, але не обмежується, акне, надлишкове секретування шкірного сала, андрогенова алопеція, гормон залежний рак, такий як рак простати, і гірсутизм. Ці сполуки, які частковими агоністами, повними агоністами або тканиноселективними агоністами можуть бути використані при лікуванні остеопорозу, гіпогонадізму, анемії або для стимулювання збільшення м'язової маси, особливо при виснажуючих хворобах.

Винахід також стосується фармацевтичних композицій, що містять, принаймні, одну з сполуки

формули I, в кількості ефективній для модулювання активації андрогенового рецептора. В наступному втіленні, винахід стосується продукту виробництва, що містить сполуку формули I, упаковану для роздрібного продажу, у поєднанні з інструкціями для покупця як використовувати сполуку для полегшення стану пов'язаного з недоречною активацією андрогенового рецептора. Додаткову втілення стосується застосування сполуки формули I, як діагностичного агенту для детектування недоречної активації андрогенового рецептора.

В наступному втіленні, сполуки формули I використовуються місцево для індукування і/або стимулювання росту волосся і/або для уповільнення випадіння волосся. Сполуки тау також можуть бути використані місцево при лікуванні надлишкового секретування шкірного сала і/або акне.

Заголовки в цьому документі використовуються тільки для зручності ознайомлення читачем. Вони не повинні трактуватись як обмеження винаходу або пунктів формули винаходу будь-яким чином.

Як використовується в цій заявці, включаючи пункти формули винаходу, наступні терміни мають значення визначені нижче, якщо спеціально не вказано інше. Множина і однина повинні трактуватись як рівноцінні значення, інші ніж вказана кількість:

а. "галоген" стосується атому хлору, фтору або бромю.

б. "C₁-C₆ алкіл" стосується розгалуженої або нерозгалуженої алкільної групи, що містить від 1 до 6 атомів вуглецю, такої як метил, етил, н-пропіл, ізопропіл, н-бутил, ізобутил, пентил, гексил, і т.і.

с. "галоалкіл" стосується розгалуженої або нерозгалуженої алкільної групи, що містить від 1 до 6 атомів вуглецю, в якій, принаймні, один атом водню замінений галогеном (тобто, C₁-C₆ галоалкіл). Прикладами придатних галоалкілів є хлорметил, дифторметил, трифторметил, 1-фтор-2-хлоретил, 5-фтор-гексил, 3-дифторізопропіл, 3-хлор-ізобутил, і т.і.

д. "гідроксиалкіл" стосується розгалуженої або нерозгалуженої алкільної групи, що містить від 1 до 6 атомів вуглецю, в якій, принаймні, один атом водню замінений гідрокси групою (тобто, C₁-C₆ гідроксиалкіл). Прикладами придатних гідроксиалкілів є гідроксиметил, 1,2-дигідроксипропіл, 1-гідроксипентил, 6-гідроксигексил, 2-гідроксиетил, і т.і.

е. "тіоалкіл" стосується розгалуженої або нерозгалуженої алкільної групи, що містить від 1 до 6 атомів вуглецю, принаймні, один атом водню замінений сульфгідрильною групою (тобто, -SH). Прикладами придатних тіоалкілів є метилмеркаптан, 2-тіолетил, 1,3-дітіолпропіл, 6-тіолгексил, 4-тіолпентил і т.і.

ф. вираз "лінійна алкіленова група, що містить від 1 до 8 атомів вуглецю" стосується алкільної групи, що містить від 1 до 8 атомів вуглецю, що є фрагментом зв'язувальної групи в межах молекули (тобто, не термінальна -CH₃ група). Прикладами

таких алкільних груп є -CH₂-, -CH₂-(CH₂)₄-CH₂-, -CH₂-(CH₂)₆-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-(CH₂)₂-CH₂-, і т.і.

д. "сольват" є кристалічною формою сполуки або її солі, що містить одну або більшу кількість молекул розчинника кристалізації, тобто, сполука формули I або її сіль і розчинник об'єднані в молекулярній формі. "Гідрат" є сольватом, в якому розчинником є вода.

h. "поліморф" є сполукою або її сіллю, такою як сполука формули I або її сіль, яка зустрічається, принаймні, в одній кристалічній формі.

i. "андроген" стосується тестостерону і його попередників і метаболітів, і 5-альфазменшуючих андрогенів, включаючи, але не обмежується, дигідротестостерон. Андроген стосується андрогенів з яєчок, надниркових залоз і яєчників, також як і всі форми природних, синтетичних і заміщених або модифікованих андрогенів.

j. "фармацевтично прийнятні солі" стосується або "фармацевтично прийнятних кислотнадитивних солей" або "фармацевтично прийнятних основнадитивних солей" в залежності від фактичної структури сполуки.

k "фармацевтично прийнятні кислотнадитивні солі" використовується для будь-якої нетоксичної органічної або неорганічної кислотнадитивної солі основних сполук представлених формулою I або будь-яких їх проміжних сполук. Ілюстративними неорганічними кислотами, які утворюють придатні солі є хлорводнева, бромводнева, сірчана і фосфорна кислота і кислі солі металів, такі як моногідроортофосфат натрію і гідросульфат калію. Ілюстративними органічними кислотами, які утворюють придатні солі, є моно-, ди- і трикарбонові кислоти. Ілюстративними прикладами таких кислот є, наприклад, оцтова, гліколева, молочна, піровиноградна, малінова, бурштинова, глутарова, фумарова, яблучна, винна, лимонна, аскорбінова, малеїнова, гідроксималеїнова, бензойна, гідрокси-бензойна, фенілоцтова, циннамова, саліцилова, 2-феноксibenзойна, п-толуолсульфонова кислота і сульфонові кислоти, такі як метансульфонова кислота і 2-гідроксиетансульфонова кислота. Такі солі можуть існувати в або гідратованій, або, по суті, безводній формі. Загалом, кислотнадитивні солі цих сполук є розчинами у воді і різних гідрофільних органічних розчинниках.

l. "фармацевтично прийнятні основнадитивні солі" використовується для будь-якої нетоксичної органічної або неорганічної основнадитивної солі сполук представлених формулою I або будь-яких їх проміжних сполук, ілюстративними основами, які утворюють придатні солі є гідроксиди лужних металів і лужноземельних металів, такі як гідроксиди натрію, калію, кальцію, магнію або барію; амонію і аліфатичних, аліциклічних або ароматичних органічних амінів, таких як метиламін, диметиламін, триметиламін і піколін.

m. "пролікарська форма" стосується сполуки, що швидко трансформується in vivo з утворенням основної сполуки згаданих вище формул, наприклад, шляхом гідролізу в крові. Обговорення цих форм приводиться в T. Higuchi і V. Stella, "Pro-

drugs as Novel Delivery Systems," Vol.14 of the A.C.S. Symposium Series, і в Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, обидві з яких включені сюди як посилання.

п. "сполуки формули I", "сполуки винаходу" і "сполуки" використовуються по черзі по всьому описі і повинні розглядатись як синоніми.

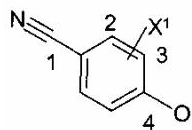
о. "пацієнт" стосується теплокровних тварин, таких як, наприклад, морські свинки, миші, щури, карликові пісчанки, кішки, кролі, собаки, мавпи, шимпанзе, безхвості макаки і люди.

р. "лікування" стосується здатності сполук або зменшувати, полегшувати або уповільнювати розвиток хвороби пацієнта (або стану) або будь-яке пошкодження тканини пов'язане з хворобою.

Деякі сполуки формули I будуть існувати як оптичні ізомери. Будь-яке посилання в цій заявці на сполуку представлену формулою I означає охоплення або специфічних оптичних ізомерів або суміші оптичних ізомерів (якщо спеціально не вказано інше). Специфічні оптичні ізомери можуть бути розділені і виділені за допомогою методик відомих в цій галузі, таких як хроматографія на хіральной стаціонарній фазі або розділення шляхом одержання хіральної солі з наступним розділенням використовуючи селективну кристалізацію. Альтернативно, використання специфічного оптичноактивного ізомеру, як вихідного матеріалу, буде давати відповідний ізомер, як кінцевий продукт.

Крім того, сполуки представленого винаходу можуть існувати в несольватованій, також як і в сольватованій формах з фармацевтично прийнятними розчинниками, такими як вода, етанол і їм подібні. Загалом, сольватовані форми розглядаються як еквівалентні несольватованим формам для цілей представленого винаходу. Сполука також може існувати в різних поліморфних формах і пункти формули винаходу охоплюють всі такі форми.

Всі сполуки формули I містять фенільне кільце. Для наступного розкриття винаходу, нумераційна система цього кільця і його замісники показані нижче



Положення 1 цього фенільного кільця завжди буде зайнято ціанозамісником як показано вище. Положення 4 буде заміщене атомом кисню, що утворює етерний замісник. Фенільне кільце також буде заміщене, як показано X¹, в положення 2 або 3, атомом галогену або галоалкільним замісником. Типово, цей галоген або галоалкільний замісник буде знаходитись в положенні 2. Більш типово, ним буде трифторалкіл, розташований в 2-положенні фенільного кільця.

Як зазначено вище, положення 4 фенільного кільця є заміщенням етерним замісником, який завжди буде включати: $-(CR^1R^2)-(ALK^1)_n-X^2$. ALK^1 , коли присутній, представляє C_1-C_8 лінійний алкіленовий замісник, такий як метилен, етилен,

пропілен, бутилен, пентилен, гексилен, гептилен або октилен. До 8 атомів водню цього алкіленового замісника можуть бути замінені одним з замісників визначених вище. Будь-який окремий атом вуглецю ALK^1 може бути незаміщеним, монозаміщеним або дизаміщеним. Ці атоми вуглецю можуть бути заміщені тим же самим замісником або різними замісниками.

Етерний замісник $-(CR^1R^2)-(ALK^1)_n-X^2$ буде заміщеним, принаймні, одним гідрокси, тіолом, гідроксиалкілом або тіоалкілом. Це може бути здійснено за допомогою одного з двох альтернативних методів заміщення (в залежності від присутності або відсутності ALK^1). Якщо ALK^1 не присутній в молекулі (тобто $n = 0$), тоді один з R^3 , R^4 або R^5 може бути представлений гідрокси, гідроксиалкілом, тіолом або тіоалкілом, або один з R^1 або R^2 може бути представлений гідроксиалкілом, тіолом або тіоалкілом, якщо ALK^1 присутній (тобто, $n \geq 1$), тоді альтернативно: а) один з R^3 , R^4 або R^5 може бути представлений гідрокси, гідроксиалкілом, тіолом або тіоалкілом, б) один з R^1 або R^2 може бути представлений гідроксиалкілом, тіолом або тіоалкілом, або в) один з атомів вуглецю ALK^1 може бути заміщеним гідрокси, гідроксиалкілом, тіолом або тіоалкілом.

Вимога, що молекула містить гідрокси або тіольну групу не повинно трактуватись як обмеження молекули тільки одним гідрокси або тіольним замісником. При бажанні, етерний замісник $-(CR^1R^2)-(ALK^1)_n-X^2$ може містити декілька гідрокси, гідроксиалкільних, тіоалкільних і тіольних функцій, що не суперечить стратегії заміщення описаній вище.

В наступному необов'язковому втіленні винаходу, для сполук, в яких $X^2 \in CR^3R^4R^5$ і $n = 0$; принаймні один з R^1 , R^2 , R^3 , R^4 або R^5 представляє собою C_1-C_6 алкіл, галоалкіл, тіоалкіл або гідроксиалкіл (тобто, етерний залишок, $-(CR^1R^2)-(ALK^1)_n-X^2$, є розгалуженим алкілом). В додатковому необов'язковому втіленні, для сполуки, в якій $X^2 \in CR^3R^4R^5$ і $n \geq 1$; принаймні один з R^1 , R^2 , R^3 , R^4 або R^5 представляє собою C_1-C_6 алкіл, галоалкіл, тіоалкіл, або гідроксиалкіл або альтернативно один атом водню ALK^1 замінений замісником, що вибирають з групи, яка містить C_1-C_6 алкіл, галоалкіл, тіоалкіл або гідроксиалкіл (тобто, етерний залишок, $-(CR^1R^2)-(ALK^1)_n-X^2$, є розгалуженим алкілом).

Більш специфічні втілення винаходу стосуються сполук формули I, в якій:

1) $X^1 \in CF_3$ і розташований в 2-положенні фенільного кільця і $X^2 \in CR^3R^4R^5$, в якій один з R^3 , R^4 або R^5 є гідрокси;

2) $X^1 \in Cl$ і розташований в 2-положенні фенільного кільця і $X^2 \in CR^3R^4R^5$, в якій один з R^3 , R^4 або R^5 є гідрокси;

3) $X^1 \in CF_3$ і розташований в 2-положенні фенільного кільця, R^1 є водень і $R^2 \in C_1-C_6$ алкіл, $n \in 1$, в якій ALK^1 є метилен, етилен, пропілен або бутилени, $X^2 \in -CR^3R^4R^5$, в якій R_3 є водень або C_1-C_6 алкіл, R^4 є водень або C_1-C_6 алкіл, і R^5 є гідрокси;

4) $X^1 \in CF_3$ і розташований в 2-положенні фенільного кільця, R^1 є водень або C_1-C_6 алкіл, R^2

є водень, $n \in 0$, і $X^2 \in CR^3R^4R^5$, в якій R_3 є гідрокси або гідроксиалкіл, R^4 є водень або C_1-C_6 алкіл і R^5 є водень; або

5) $X^1 \in CF_3$ або Cl , і розташований в 2-положенні фенільного кільця, R^1 і R^2 є кожен водень, $n \in 1$, в якій Alk^1 є метилен, етилен, пропілен, або бутилен, який є заміщеним 1-3 замісниками, що незалежно, вибирають з гідрокси, гідроксиалкілу або C_1-C_6 алкілу і $X^2 \in CR^3R^4R^5$, в якій R_3 є водень або гідрокси, і R^4 і R^5 є кожен водень або C_1-C_6 алкіл.

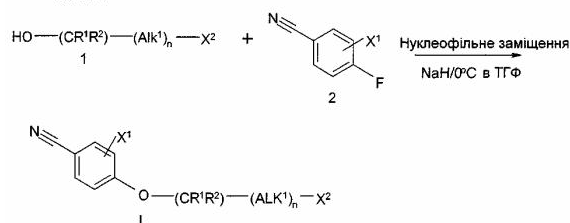
Більш специфічними прикладами сполук, що охоплюються формулою I, є:

- i) 4-(2-гідрокси-1-етилпропокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- ii) 4-(2-гідрокси-1-метилпропокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- iii) 4-(3-гідрокси-1-метилбутокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- iv) 4-(2-гідрокси-6-метилгептилокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- v) 4-(2-гідрокси-7-гідроксигептилокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- vi) 4-(2-гідроксиоктилокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- vii) 4-(2-гідрокси-8-гідрокси-8-метилоктилокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- viii) 4-(2-гідроксиокт-7-енілокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- ix) 4-(2-гідроксиокт-7-инілокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- x) 4-(2-етил-3-гідроксибутокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- xi) 4-(3-гідроксибутокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- xii) 4-(3-гідроксигекс-5-енілокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- xiii) 4-(3-гідроксигекс-5-инілокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- xiv) 4-(3-гідрокси-2-метилбутокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- xv) 4-(3-гідрокси-2-пропілбутокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- xvi) 4-(3-гідрокси-2,2-диметилпропокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- xvii) 4-(3-гідрокси-3-метилбутокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- xviii) 4-(4-гідрокси-3-метилпентокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- ix) 4-(3-гідрокси-2,2,4-триметилпентилокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- xx) 4-(2-етил-3-гідроксигексиллокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- xi) 4-[2-(1-гідроксиетил)гексиллокси]-2-трифторметилбензонітрил;
- xxii) 4-(3-гідрокси-1-метилбутокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- xxiii) 4-(3-гідрокси-1-метил-2-етилбутокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- xxiv) 4-(4-гідроксибутокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- xxv) 4-(6-гідроксигептокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- xxvi) 4-(4-гідроксигептилокси)-2-трифторметилбензонітрил;

- xxvii) 4-(4-гідрокси-1-пропілбутокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- xxviii) 4-(4-гідрокси-1-метилпентилокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- xxix) 4-(5-гідроксипентилокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- xxx) 4-(5-гідроксигексиллокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- xxxi) 4-(5-гідрокси-3-метилпентилокси)-2-трифторметилбензонітрил;
- xxxii) 2-хлор-4-(3-гідрокси-2,2,4-триметилпентилокси)бензонітрил;
- xxxiii) 2-хлор-4-(4-гідроксибутокси)бензонітрил;
- xxxiv) 2-хлор-4-(3-гідроксипропокси)бензонітрил;
- xxxv) 2-хлор-4-(1-гідроксиметилалілокси)бензонітрил;
- xxxvi) 2-хлор-4-(1-гідроксиметилацетиленокси)бензонітрил;
- xxxvii) 2-хлор-4-(3-гідрокси-2-метилпропокси)бензонітрил;
- xxxviii) 2-хлор-4-(5-гідроксипентилокси)бензонітрил;
- xxxix) 2-хлор-4-(4-гідрокси-1-метилпентилокси)бензонітрил, або;
- xi) 2-хлор-4-(5-гідрокси-3-метилпентилокси)бензонітрил.

Сполуки формули I можна одержати використовуючи методи аналогічні відомим в цій галузі для одержання етерів. Увага читача звертається на Європейську патентну заяву 58932, опубліковану 1 вересня 1982, вміст якої включений сюди як посилання для опису таких реакцій. Схема I, нижче, розкриває одну з таких методик:

СХЕМА I



Як показано вище, одним з вихідних матеріалів є спирт як показано на структурі 1. R^1 , R^2 , Alk^1 і X^2 повинні бути представлени тим же самими замісниками як необхідно в кінцевому продукті. Ці спирти відомі в цій галузі і можуть бути одержані з відомих комерційних джерел. Альтернативно, вони можуть бути одержані як описано Tetrahedron: Asymmetry, 1991 Vol.2, page 569.

Іншим вихідним матеріалом є 4-фторбензонітрил, представлений структурою 2. X^1 повинен бути представлений тими ж самими замісниками, як необхідно в кінцевому продукті. Ці бензонітрили відомі в цій галузі і можуть бути синтезовані як описано в Японській заявці на патент 01097937.

Нуклеофільне заміщення показана вище проводять як відомо з літератури. Спирт структури 1 контактує з невеликим надлишком основи, таким як гідрид натрію, з утворенням алкоксид іону. Реакцію проводять в апротонному розчиннику,

такому як тетрагідрофуран, в інертній атмосфері (типово, азот) при температурі приблизно 0°C. Спирт перемішують з основою протягом часу в інтервалі від 5 до 60 хвилин.

Один еквівалент 4-фтор-бензонітрилу структури 2 додають до реакційного середовища і реагенти перемішують достатній для заміни фтору бензонітрилу алкоксид іоном проміжок часу. Типово для цього необхідно від 30 хвилин до 24 годин. Реакцію типово проводять нагріваючи до кімнатної температури.

Бажаний продукт формули I можна виділити шляхом екстрагування, упарювання або інших методик відомих в цій галузі. Він може бути, необов'язково, очищений шляхом хроматографії, перекристалізації, перегонки або інших методик відомих в цій галузі.

Як повинно бути зрозуміло спеціалісту в цій галузі, деякі способи корисні для одержання таких сполук, як описано вище, можуть потребувати захисту окремих функціональних груп, наприклад, для попередження впливу таких функціональних груп на реакції в інших місцях молекули або для збереження цілісності таких функціональних груп. Необхідність і тип такого захисту легко визначить середній спеціаліст в цій галузі і він буде залежати від, наприклад, природи функціональної групи і умов вибраного способу одержання. Дивіться, наприклад, T.W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 1991.

Деякі сполуки цього винаходу є кислотами і вони можуть утворювати солі з фармацевтично прийнятним катіоном. Деякі сполуки цього винаходу є основними і утворюють солі з фармацевтично прийнятними аніонами. Всі такі солі попадають в межі цього винаходу і можуть бути одержані за допомогою звичайних методів, таких як комбінування кислотного і основного складових, зазвичай в стехіометричному співвідношенні, в або водному, неводному, або частково водному середовищі, як необхідно. Солі виділяють або фільтруванням, осадженням нерозчинником з наступним фільтруванням, упарюванням розчинника, або, у випадку водних розчинів, ліофілізацією, в залежності від обставин. Сполуки одержують в кристалічній формі згідно з методиками відовими в цій галузі, такими як розчинення в прийнятному розчиннику(ах), такому як етанол, гексани або суміші вода/етанол.

Сполуки формули I є модуляторами андрогенового рецептора. Вони можуть бути використані для полегшення станів пов'язаних з недоречною активацією андрогенового рецептора. Сполуки діють як антагоністи андрогену і можуть бути використані для лікування, або полегшення, гормонзалежного раку, такого як карцинома простати, доброякісна гіперплазія простати, акне, гірсутизм, надмірне виділення шкірного сала, алопеції, гіпертрихоз, передчасне статеве зізрівання, простамегалія, вирилізація і синдром полікістозу яєчника. Сполуки діють як часткові агоністи або повні агоністи можуть бути використані при лікуванні або полегшенні гіпогонадізму у чоловіків, сексуальних дисфункцій

у чоловіків (імпотенція, чоловіча дисперматогенна безплідність), ненормальна сексуальна диференціація (чоловічий гермафродитизм), затримання статевого дозрівання у чоловіків, чоловіча безплідність, апластична анемія, гемолітична анемія, серповидноклітинна анемія, ідіопатична тромбоцитопенічна пурпура, мієлофіброз, ниркова анемія, виснажуючі хвороби (післяопераційні стани, злоякісна пухлина, травма, хронічне ниркове захворювання, опік або СНІД), зменшення болю при термінальній карциномі жіночих геніталій, неоперабельний рак грудей, мастопатія, ендометріоз, сексуальна дисфункція у жінок, остеопороз, загоєння ран і регенерація м'язової тканини.

Для того щоб проявились терапевтичні властивості описані вище, сполуки необхідно ввести в кількості достатній для модулювання активності андрогенового рецептора. Ця кількість може значно залежати від особливостей захворювання/стану, що піддається лікуванню, складності захворювання/стану пацієнта, самого пацієнта, сполуки, що вводиться, шляху введення і присутності інших захворювань у пацієнта і т.і. Коли вводиться системно, сполуки типово проявляють свою дію в дозах в інтервалі від приблизно 0,1мг/кг/день до приблизно 100мг/кг/день для будь-якого захворювання або стану приведенного вище. Може бути бажано повторюване введення протягом доби і буде змінюватись у відповідності з умовами приведеними вище.

Сполуки представленого винаходу можуть бути введенні різними шляхами. Вони є ефективними, якщо вводяться перорально. Сполуки також можуть вводиться парентерально (тобто, підшкірно, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, внутрішньоочеревенно або інтратекально), ректально або місцево.

В типовому втіленні, сполуки вводять місцево. Місцеве введення є особливо прийнятним при гірсутизмі, алопеції, акне і надмірному виділенні шкірного сала. Доза буде змінюватись, але як зазвичай визначається, сполука буде присутня в дерматологічно прийнятному носії в кількості від приблизно 0,01 до 50в/в%, і більш типово від приблизно 0,1 до 10в/в%. Дерматологічна рецептура буде наноситись на уражену поверхню від 1 до 4 разів на день. "Дерматологічно прийнятний" стосується носія, який може наноситись на шкіру або волосся, і який буде дозволяти лікарському засобу дифузувати в місце дії. Більш специфічно, це стосується місця, в якому бажане інгібування дії андрогенового рецептора.

В наступному втіленні, сполуки використовуються місцево для зменшення алопеції, особливо андрогенової алопеції. Андрогени мають сильну дію як на ріст волосся, так і на втрату волосся. В більшості місць тіла, таких як борода і лобкова область, андрогени стимулюють ріст волосся шляхом пролонгування фази росту циклу волосся (анаген) і збільшують розмір фолікули. Ріст волосся на шкірі голови не потребує андрогенів, але, парадоксально,

андрогени необхідні для випадіння волосся на шкірі голови у генетично схильних осіб (андрогенова алопеція), коли спостерігається прогресуюче зменшення тривалості фази анагену і розміру фолікул волосся. Андрогенова алопеція також є звичайною у жінок, де вона зазвичай присутня як розсіяна втрата волосся порівняно з локалізованою, що спостерігається у чоловіків.

В той час як сполуки найбільш типово використовуються для полегшення андрогенової алопеції, винахід не обмежується цим специфічним станом. Сполуки можуть бути використані для полегшення будь-яких типів алопеції. Прикладами не-андрогенової алопеції є алопеція ареата, алопеція внаслідок радіотерапії або хіміотерапії, ребцевидна алопеція, стресозалежна алопеція і т.і. Як використовується в цьому описі, "алопеція" стосується часткової або повної втрати волосся на шкірі голови.

Таким чином, сполуки можуть бути нанесені місцево на шкіру голови і волосся для попередження або полегшення облісіння. Крім того, сполука може бути використана місцево для того щоб індукувати або промотувати ріст волосся на шкірі голови.

В наступному втіленні винаходу, сполуку формули I наносять місцево для того щоб попередити ріст волосся в місцях, де ріст такого волосся є небажаним. Одним з таких застосувань буде полегшення гірсутизму. Гірсутизмом є надмірний ріст волосся в місцях, в яких типово волосся не росте (тобто, лице жінки). Такий неприйнятний ріст волосся найбільш часто зустрічається у жінок і часто спостерігається в період менопаузи. Місцеве введення сполуки буде полегшувати цей стан призводячи до зниження або усунення цього невідповідного або небажаного росту волосся.

Сполуки також можуть використовуватись місцево для зменшення продукування шкірного сала і більш специфічно для пом'якшення жирніння шкіри. Також сполуки можуть бути використані місцево для полегшення акне.

В наступному втіленні, ці сполуки діють як часткові агоністи або повні агоністи, і можуть бути використані для лікування або полегшення остеопорозу. Остеопороз характеризується втратою кісткової маси, що є наслідком розбалансування резорбції кістки (руйнування) і утворення кістки, який починається в четвертій декаді і продовжується протягом життя із швидкістю приблизно 1-4% на рік [Eastell, Treatment of postmenopausal osteoporosis, New Eng. J. Med. 338: 736, 1998]. В Сполучених Штатах, на даний момент приблизно у 20 мільйонів людей реєструються переломи хребта внаслідок остеопорозу. Крім того, реєструється приблизно 250000 переломів стегна на рік внаслідок остеопорозу, що пов'язують з 12%-20% смертей в перші два роки, в той час як 30% пацієнтів потребують поміщення у дім інвалідів після перелому і багато з них ніколи не стають повністю здоровими після таких випадків. У постменопаузальних жінок, дефіцит естрогену призводить до збільшення резорбції кістки і

відповідно втрати кісткової маси хребта приблизно 5% на рік, негайно після менопаузи. Таким чином, першочерговим при лікуванні/попередженні цього стану є інгібування резорбції кістки використовуючи бісфосфонати, естрогени, селективні модулятори рецептора естрогену (SERM) і кальцитонін. Однак, інгібітори резорбції кістки недостатньо відновлюють кісткову масу у пацієнтів, які вже мають значну втрату кістки. Збільшення спинної BMD, що досягається шляхом лікування бісфосфонатом, може складати 11% після 7 років лікування алендронатом. Крім того, коефіцієнт обертання кістки відрізняється від місця до місця, найбільший в трабекулярній кістці хребта порівняно з кіркою довгих кісток, інгібітори резорбції кістки є менш ефективними при збільшенні BMD стегна і профілактиці перелому стегна. Тому, остеонаболічні агенти, які збільшують утворення коркової/надкісничної частини кістки і кісткову масу довгих кісток, будуть спрямовані на незадовільнену потребу при лікуванні остеопорозу особливо у пацієнтів з високим ризиком перелому стегна.

Ряд досліджень демонструють, що андрогени є остеонаболіками у жінок і чоловіків. Анаболічні стероїди, такі як нандролон деканоат або станозолол, показують збільшення кісткової маси у постменопаузальних жінок. Цілюща дія андрогенів на кістки при постменопаузальному остеопорозі добре задокументована в нещодавніх дослідженнях використовуючи спільне введення тестостерону і естрогену [Hofbauer, et al., Androgen effects on bone metabolism: recent progress and controversies, Eur. J. Endocrinol. 140, 271-286, 1999]. Таким чином, сполуки формули I проявляючи агоністичну або часткову агоністичну активність можуть бути використані при лікуванні або полегшенні остеопорозу, включаючи первинний остеопороз, такий як старечий, постменопаузальний і ювенільний остеопороз, також як і вторинний остеопороз, такий як остеопороз внаслідок гіпертіроїдизму або синдрому Кушинга (внаслідок лікування кортикостероїдами), акромегалії, гіпогонадізму, дизостеогенезу і гіпофосфатаземії. Іншими кістковозалежними станами, що коригуються при лікуванні агоністами андрогену є остеопорозний перелом, дитяча ідіопатична втрата кісткової маси, альвеолярна втрата маси, нижньощелепова втрата маси, перелом кістки, остеотомія, періодонтит або вrostання протезу.

Ці сполуки, що діють як агоністи або часткові агоністи також можуть використовуватись для стимулювання збільшення м'язової маси у пацієнтів уражених виснажуючими хворобами, такими як СНІД, ракова кахесія, опіки, захворювання нирок і т.і. Пацієнти, що страждають від травми, пролежнів, віку і т.і. також можуть одержати користь від анаболічної дії андрогенів.

В наступному втіленні винаходу, сполуки формули I можуть бути введені разом з іншими сполуками для додаткового підвищення їх активності або зменшення потенційних побічних ефектів. Наприклад, відкривачі калієвих каналів, такі як міноксидил, є відомим стимулятором росту

волосся і індукування анагену. Прикладами інших відкривачі калієвих каналів є (3S,4R)-3,4-дигідро-4-(2,3-дигідро-2-метил-3-оксопіридазин-6-іл)окси-3-гідрокси-6-(3-гідроксифеніл)сульфоніл-2,2,3-триметил-2Н-бензо[*b*]піран, діаксозид, і PO 1075, який розроблений Leo Pharmaceuticals. Гормон щитовидної залози також відомий як стимулятор росту волосся. Синтетичні замінник гормону щитовидної залози (тобто, тіроміметики), як було показано, також стимулюють ріст волосся. Такі тіроміметики були описані в літературі раніше. Увага читача звертається на Європейську патентну заявку №1262177, вміст якої включений сюди як посилання, для обговорення таких сполук і їх застосування для полегшення алопеції. Однією з особливо цікавих сполук є 2-{4-[3-(4-фторбензил)-4-гідроксифенокси]}-3,5-диметилфеніл}-2Н-[1,2,4]триазин-3,5-діон.

Антиандрогени можуть діяти за рядом різних механізмів. Наприклад, деякі сполуки блокують перетворення тестостерону у 5- α -дигідротестостерон, який відповідає за біологічну дію в багатьох тканинах. Інгібітори 5-альфа-редуктази, такі як фінастурід, стимулюють ріст волосся. Фінастурід є комерційно доступним від Merck під торговою назвою Пропеція®. Прикладом інших інгібіторів 5- α -редуктази є дугастейд (Glaxo Smithkline). Такі сполуки можна вводити разом з сполуками формули I для полегшення алопеції.

Інгібітори протеїнкінази C, як було показано, стимулюють ріст волосся і індукують анаген. Калфостин C, який є селективним інгібітором протеїнкінази C, індукує анаген. Інші селективні інгібітори протеїнкінази C, такі як гексадецилфосфохолін, пальмітоїл-DL-карнітин хлорид і поліміксин B сульфат, як було показано, індукують анаген. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 2000 May-Aug; 13(3-4): 133-42. Будь-які такі інгібітори протеїнкінази C можна вводити разом з сполуками формули I для полегшення алопеції.

Імунофіліни є родиною цитоплазматичних протеїнів. Їх лігандами є циклоспорин, FK506 і рапаміцин. Їх виділяють з грибків і спочатку вони пропонувались як сильні імуносупресивні агенти. Циклоспорин зв'язує протеїн, циклофілін, в той час як FK506 і рапаміцин зв'язують FK-зв'язуючий протеїн (FKBP). Всі ці сполуки, як було показано, стимулюють ріст волосся і індукують анаген. Будь-які такі імунофіліни можна вводити разом з сполуками формули I для полегшення алопеції.

Як використовується в цьому описі, спільне введення стосується введення сполуки формули I з другим агентом для лікування алопеції, типово, що має інший механізм дії, використовуючи режим дозування, що промотує ріст волосся у пацієнта. Це може стосуватись одночасного введення, введення в різний час протягом одного дня або навіть введення в різні дні. Сполуки можуть вводитись окремо або можуть комбінуватись в одну рецептуру. Методики одержання таких рецептур описуються нижче.

При бажанні, сполуки можна вводити безпосередньо без будь-якого носія. Однак, для полегшення введення, вони типово вволяться у фармацевтичні носії. Також, більш типово вони

вводяться в дерматологічні або косметичні носії. В цій заявці терміни "дерматологічний носій" і "косметичний" носій використовуються по черзі. Вони відносяться до рецептур призначених для нанесення безпосередньо на шкіру або волосся.

Фармацевтичні і косметичні композиції можуть виготовлятися використовуючи методики відомі в цій галузі. Типово ефективну кількість сполуки змішують з фармацевтично/косметично прийнятним носієм.

Для перорального введення, сполуки можуть формулюватись в тверді або рідкі рецептури, такі як капсули, пігулки, таблетки, лозенги, ледяники, порошки, суспензії або емульсії. Тверді одиничні дозовані форми можуть бути капсулами із звичайного желатину, що містять, наприклад, поверхнево активні речовини, змашувальні агенти і інертні наповнювачі, такі як лактоза, цукроза і кукурудзяний крохмаль або вони можуть бути рецептурами з тривалим вивільненням.

В іншому втіленні, сполуки формули I можуть бути таблетовані використовуючи звичайні основи для таблеток, такі як лактоза, цукроза і кукурудзяний крохмаль в комбінації із зв'язувальними агентами, такими як акація, кукурудзяний крохмаль або желатин, дезінтеграторами, такими як кукурудзяний крохмаль або алгінова кислота, і змашувальний агент, такий як стеаринова кислота або стеарат магнію. Рідкі рецептури одержують шляхом розчинення активного інгредієнту у водному або неводному фармацевтично прийнятному розчиннику, який також може містити суспендувальні агенти, підсолоджувачі, ароматизатори і консерванти, які є відомими в цій галузі.

Для парентерального введення сполуки можна розчинити у фізіологічно прийнятному фармацевтичному носії і використовувати або як розчин, або як суспензію. Ілюстративними прикладами придатних фармацевтичних носіїв є вода, салін, розчини декстрози, розчини фруктози, етанол або тваринні, рослинні або синтетичні жири. Фармацевтичний носій також може містити консерванти, буферувальні агенти і т.і., які є відомими в цій галузі. Коли сполуки вводяться інтратекально, вони можуть бути розведені в цереброспинальній рідині, як відомо в цій галузі.

Сполуки цього винаходу типово наносяться місцево. Як тут використовується, місцево стосується нанесення сполук (і необов'язково носія) безпосередньо на шкіру і/або волосся. Місцева композиція у відповідності з представленим винаходом може бути у формі розчинів, лосьйонів, бальзамів, кремів, мазей, ліпосомів, спреїв, гелів, пін або будь-яких інших рецептур, що регулярно використовуються в дерматології.

Таким чином, наступне втілення стосується косметичних або фармацевтичних композицій, зокрема дерматологічних композицій, якій містять принаймні одну з сполук, що відповідають Формулі I, вище. Такі дерматологічні композиції будуть містити від 0,001% до 10% в/в% сполук у поєднанні з дерматологічно прийнятним носієм, і

більш типово, від 0,1 до 5в/в% сполук. Такі композиції будуть типово використовуватись від 1 до 4 разів на день. Увага читача звертається на Remington's Pharmaceutical Science, Edition 17, Mack Publishing Co., Easton, PA для ознайомлення з тим як одержати такі рецептури.

Композиції згідно з винаходом також можуть входити до складу твердих рецептур, що включають очищаючі мила або куски. Ці композиції одержують згідно із звичайними методиками.

Сполуки також можуть бути нанесені на волосся у формі водних, спиртових або водно-спиртових розчинів або у формі кремів, гелів, емульсій або мусів, або, альтернативно, у формі аерозольних композицій, що містять пропелант під тиском. Композиція згідно з винаходом також може бути композицією для догляду за волоссям і, зокрема, шампунем, лосьйоном для фіксації волосся, лосьйоном для лікування, кремом або гелем для моделювання волосся, фарбою, лосьйоном або гелем для профілактики випадіння волосся і т.і. Кількості різних складових в дерматологічних композиціях згідно з винаходом є звичайно використовуваними в цих галузях.

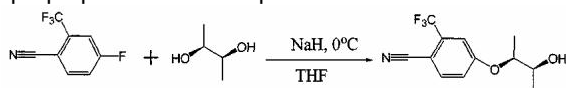
Медичні і косметичні препарати, що містять сполуку винаходу типово пакуються для роздрібної торгівлі (тобто, виріб). Такі вироби мають наклейки і пакуються таким чином, щоб забезпечити пацієнта інструкцією по використанню продукту. Такі інструкції будуть включати умови лікування, тривалість лікування, дозування, і т.і.

Сполуки формули I також можуть змішуватись з будь-яким інертним носієм і використовуватись в лабораторних дослідженнях для визначення концентрації сполук в сироватці, сечі, і т.і., пацієнта, як є відомо в цій галузі. Сполуки також можуть використовуватись як інструмент дослідження.

В той час як винахід описується у зв'язку з специфічними втіленнями, зрозуміло, що є можливість наступних модифікацій і ця заявка призначена для охоплення будь-яких наступних варіацій, застосувань або адаптацій винаходу, загалом, принципів винаходу і включаючи такі відхилення від представленої опису як буде з межах знань або звичайної практики в галузі, до якого належить винахід. Наступні приклади і біологічні дані представлена для того щоб додатково проілюструвати винахід. Цей опис не повинен розглядатись як обмеження винаходу будь-яким чином.

Приклад 1

(1S,2S)-4-(2-Гідрокси-1-метилпропокси)-2-трифторметилбензонітрил



NaH (0,20г, 4,14ммоль) суспендували в 15мл сухого ТГФ, потім додавали (2S,3S)-(+)-2,3-бутандіол (0,32г, 3,45ммоль, в 5мл сухого ТГФ). Цю суміш перемішували при 0°C протягом 10 хвилин, після чого додавали 4-фтор-2-трифторметилбензонітрил. Реакційну суміш перемішували, 0°C протягом 1 години, в атмосфері азоту. Суміш перемішували протягом

ще 2 годин, при кімнатній температурі, під кришкою. Реакцію гасили 25мл дистильованої води, екстрагували етилацетатом (3×20мл). Продукт очищали колонковою хроматографією, використовуючи гексан:етилацетат = 5:1 до 1:1, як елюент, одержуючи чистий продукт.

МС: 260,0 (M+1 для C₁₂H₁₂F₃NO₂) РХМС: Колонка C-18 (50%Н₂О/50%СН₃СN), Час утримання. 1,81хв.

Приклади 2-27

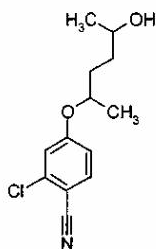
Використовуючи загальну методику Прикладу 1, але замінюючи відповідні вихідні матеріали, одержували сполуки описані в Таблиці 1. Хроматографію проводили на фракційному колекторі Foxu 200, використовуючи колонку Biotage Silicon Gel, (вода:метилнітрил використовували як елюент, 50:50, у всіх прикладах за винятком 8, 16, 17, 26, де використовували 25:75 суміш вода:метилнітрил). Масспектр в Таблиці I знімали на масспектрометрі Hewlett Packard.

Таблиця 1				
Приклад	Структура	Назва	ЧУ	Основний пік
2		(1R,2R)-4-(2-Гідрокси-1-метилпропокси)-2-трифторметилбензонітрил	1,85	МС: 260,0 (M+1 для C ₁₂ H ₁₂ F ₃ NO ₂)
3		4-(2-Гідрокси-1-метилпропокси)-2-трифторметилбензонітрил	1,80	МС: 260,0 (M+1 для C ₁₂ H ₁₂ F ₃ NO ₂)
4		4-(2-Гідрокси-6-метилгептилокси)-2-трифторметилбензонітрил	1,95	МС: 316,2 (M+1 для C ₁₆ H ₂₀ F ₃ NO ₂)
5		4-(2-Гідроксиоктилокси)-2-трифторметилбензонітрил	1,76	МС: 316,2 (M+1 для C ₁₆ H ₂₀ F ₃ NO ₂)
7		4-(3-Гідроксибутокси)-2-трифторметилбензонітрил	2,50	МС: 260,1 (M+1 для C ₁₂ H ₁₂ F ₃ NO ₂)
8		(3S)-4-(3-Гідроксибутокси)-2-трифторметилбензонітрил	0,91	МС: 260,1 (M+1 для C ₁₂ H ₁₂ F ₃ NO ₂)
9		4-(3-Гідроксипентилокси)-2-трифторметилбензонітрил	2,42	МС: 280,0 (M+1 для C ₁₄ H ₁₄ F ₃ NO ₂)

10		4-(3-Гідрокси-2-метилбутокси)-2-трифторметилбензонітрил	2,12	МС: 274,0 (M+1) для $C_{13}H_{14}F_3NO_2$
11		4-(3-Гідрокси-2,2-диметилпропокси)-2-трифторметилбензонітрил		
12		4-(3-Гідрокси-3-метилбутокси)-2-трифторметилбензонітрил	2,25	МС: 274,1 (M+1) для $C_{13}H_{14}F_3NO_2$
13		4-(3-Гідрокси-2,2,4-триметилпентилокси)-2-трифторметилбензонітрил		
14		4-(2-Етил-3-Гідроксигексилокси)-2-трифторметилбензонітрил	3,8	МС: 316,2 (M+1) для $C_{16}H_{20}F_3NO_2$
15		4-[2-(1-Гідрокси-етил)-гексилокси]-2-трифторметилбензонітрил	1,6	МС: 316,2 (M+1) для $C_{16}H_{20}F_3NO_2$
16		(1S,3S)-4-(3-Гідрокси-1-метилбутокси)-2-трифторметилбензонітрил	1,03	МС: 274,0 (M+1) для $C_{13}H_{14}F_3NO_2$
17		(1R,3R)-4-(3-Гідрокси-1-метилбутокси)-2-трифторметилбензонітрил	1,02	МС: 274,0 (M+1) для $C_{13}H_{14}F_3NO_2$
18		4-(4-Гідроксибутокси)-2-трифторметилбензонітрил		МС: 260,0 (M+1) для $C_{12}H_{12}F_3NO_2$
19		4-(4-Гідроксибутокси)-2-трифторметилбензонітрил	1,52	МС: 274,0 (M+1) для $C_{13}H_{14}F_3NO_2$
20		4-(4-Гідроксигептилокси)-2-трифторметилбензонітрил	3,10	МС: 302,1 (M+1) для $C_{15}H_{16}F_3NO_2$
21		4-(4-Гідрокси-1-пропілбутокси)-2-трифторметилбензонітрил	3,16	МС: 302,1 (M+1) для $C_{15}H_{16}F_3NO_2$
22		4-(4-Гідрокси-1-метилпентилокси)-2-трифторметилбензонітрил	2,27	МС: 288,1 (M+1) для $C_{14}H_{16}F_3NO_2$
23		(1S,4S)-4-(4-Гідрокси-1-метилпентилокси)-2-трифторметилбензонітрил	2,29	МС: 288,1 (M+1) для $C_{14}H_{16}F_3NO_2$
24		4-(5-Гідроксипентилокси)-2-трифторметилбензонітрил	1,94	МС: 274,0 (M+1) для $C_{13}H_{14}F_3NO_2$
25		4-(5-Гідроксигексилокси)-2-трифторметилбензонітрил	2,31	МС: 288,0 (M+1) для $C_{14}H_{16}F_3NO_2$
26		4-(5-Гідрокси-3-метилпентилокси)-2-трифторметилбензонітрил	1,01	МС: 288,2 (M+1) для $C_{14}H_{16}F_3NO_2$

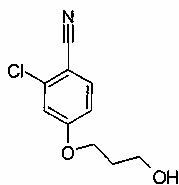
27		2-Хлор-4-(3-Гідрокси-2,2,4-триметилпентилокси)бензонітрил	1,70	МС: 282,1 (M+1) для $C_{15}H_{18}ClNO_2$
6		4-(2-Гідроксиокт-7-енілокси)-2-трифторметилбензонітрил	3,19	МС: 314,1 (M+1) для $C_{16}H_{18}F_3NO_2$

Приклад 28
2-Хлор-4-(4-гідрокси-1-метилпентилокси)бензонітрил



До розчину 2,5-гександіолу (28мг, 0,240ммоль) в тетрагідрофурани додавали надлишок буюксіду калію. Суміш перемішували, швидко, і додавали 2-хлор-4-фтор-бензонітрил (37мг, 0,240ммоль). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 72 годин. Очищали за допомогою високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою, використовуючи як елюент градієнт розчинників (15% 0,1% мурашина кислота / CH_3CN в 0,1% мурашина кислота / вода) одержуючи 28,4мг 2-хлор-4-(4-гідрокси-1-метилпентилокси)бензонітрилу. 1H ЯМР ($CDCl_3$) δ 7,50 (д, 1H), 6,95 (м, 1H), 6,79 (ш д, 1H), 4,43 (м, 1H), 3,79 (м, 1H), 1,89-1,40 (м, 4H), 1,30 (д, 3H), 1,17 (д, 3H); МС m/z 253.

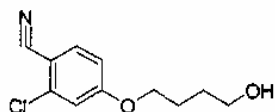
Приклад 29
2-Хлор-4-(3-гідроксипропокси)бензонітрил



До 1,3-пропандіолу (320мг, 4,2ммоль) додавали натрій (21мг, 0,92ммоль) Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 10 хвилин і додавали 2-хлор-4-фтор-бензонітрил (156мг, 1,0ммоль). Реакцію нагрівали до 105°C протягом 24 годин. Реакцію охолоджували до кімнатної температури, розводили водою і екстрагували Et_2O (3х). Органічний розчин сушили ($MgSO_4$), фільтрували і концентрували. Залишок очищали за допомогою високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою, використовуючи як елюент градієнт розчинників (15% 0,1% мурашина кислота / CH_3CN в 0,1% мурашина кислота / вода) до 100% 0,1% мурашина кислота / вода), одержуючи 107мг 2-хлор-4-(3-гідроксипропокси)бензонітрилу. 1H ЯМР ($CDCl_3$) δ 7,54 (д, 1H), 7,00 (м, 1H), 6,85 (дд, 1H), 4,15 (т, 2H), 3,83 (т, 2H), 2,04 (м, 2H).

Приклад 30

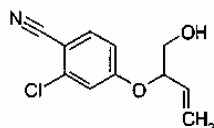
2-Хлор-4-(4-гідроксибутокс)бензонітрил



Слідували методиці описаній для Прикладу 29, 1,4-бутандіол (1мл, 10ммоль) реагував з 2-хлор-4-фторбензонітрилом (159мг, 1,0ммоль) протягом 24 годин при кімнатній температурі. Очищали за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії з оберненою фазою, використовуючи як елюент градієнт розчинників (15% 0,1% мурашина кислота / CH_3CN в 0,1% мурашина кислота / вода), одержуючи 10мг 2-хлор-4-(4-гідроксибутокс)бензонітрилу. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 7,54 (д, 1H), 6,98 (д, 1H), 6,83 (дд, 1H), 4,03 (т, 2H), 3,71 (т, 2H), 1,90 (м, 2H), 1,72 (м, 2H); МС 226,1 (M+1).

Приклад 31

2-Хлор-4-(1-гідроксиметилалілокси)бензонітрил



Стадія А: 1-(трет-Бутил-диметилсиланілокси)-бут-3-ен-2-ол

До розчину (+/-)-3-бутен-1,2-діолу (500мг, 5,67ммоль) в CH_2Cl_2 (25мл) додавали імідазол (444мг, 6,53ммоль). Розчин охолоджували до 0°C і додавали т-бутилдиметилсилілхлорид (1,0М в ТГФ, 6,24мл, 6,24ммоль). Реакцію перемішували при 0°C протягом 15 хвилин і при кімнатній температурі протягом 1 години і 30 хвилин. Суміш розводили водним NH_4Cl і екстрагували CH_2Cl_2 (3×). Органічний розчин промивали розсоллом, сушили (MgSO_4), фільтрували і концентрували. Залишок очищали за допомогою хроматографії середнього тиску, використовуючи як елюент градієнт розчинників (5% EtOAc в гексанах до 100% EtOAc) одержуючи 827,5мг 1-(трет-бутилдиметилсиланілокси)-бут-3-ен-2-олу. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 5,81 (м, 1H), 5,34 (д, 1H), 5,19 (д, 1H), 4,17 (м, 1H), 3,66 (дд, 1H), 3,45 (дд, 1H), 0,90 (с, 9H), 0,08 (с, 6H); МС m/z 202.

Стадія

Б:

4-[1-(трет-Бутилдиметилсиланілоксиметил)алілокси]-2-хлорбензонітрил

До розчину 1-(трет-бутилдиметилсиланілокси)бут-3-ен-2-олу (1,102г, 5,45ммоль) в ТГФ (26мл) при -78°C додавали трет-бутоксид калію (1,0М в ТГФ, 5,99мл, 5,99ммоль). Розчин перемішували протягом 15 хвилин і при -78°C додавали 2-хлор-4-фторбензонітрил (847мг, 5,45ммоль). Реакцію перемішували при кімнатній температурі протягом 24 годин, гасили водою і екстрагували EtOAc (3×). Органічний розчин промивали водою і розсоллом, сушили (MgSO_4), фільтрували і концентрували одержуючи 1,67г 1:1 суміші

4-[1-(трет-

бутилдиметилсиланілоксиметил)алілокси]-2-хлорбензонітрилу і 4-[2-(трет-бутилдиметилсиланілокси)бут-3-енілокси]-2-хлорбензонітрилу. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 7,55 (м, 2H), 7,02 (м, 2H), 5,91-5,78 (м, 2H), 5,42-5,22 (м, 4H), 4,75 (м, 1H), 4,51 (м, 1H), 3,90 (м, 2H), 3,79 (м, 2H), 0,89 (с, 9H), 0,87 (с, 9H), 0,07 (с, 6H), 0,04 (с, 6H).

Стадія

В:

2-Хлор-4-(1-гідроксиметилалілокси)бензонітрил

До розчину the регіоізомерної суміші описаної вище, Приклад 31, Стадія Б, (1,67г, 4,95ммоль) в ТГФ (15мл) додавали фторид трет-бутиламонію (1,0М в ТГФ, 5,44мл, 5,44ммоль). Реакцію перемішували при кімнатній температурі протягом 15 хвилин, розводили водним NH_4Cl і екстрагували EtOAc (3×). Органічний розчин промивали розсоллом, сушили (MgSO_4), фільтрували і концентрували. Залишок очищали за допомогою хроматографії середнього тиску, використовуючи як елюент градієнт розчинників (гексани до 100% EtOAc в гексанах понад 70 хвилин), одержуючи 112мг 2-хлор-4-(1-гідроксиметилалілокси)бензонітрилу. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 7,55 (д, 1H), 7,04 (д, 1H), 6,89 (дд, 1H), 5,85-5,76 (м, 1H), 5,38 (м, 2H), 4,80 (м, 1H), 3,80 (м, 2H).

Приклад 31А

Цей Приклад надалі ілюструється одержанням (1S,4S)-4-(4-гідрокси-1-метилпентилокси)-2-трифторметилбензонітрилу, продукт Прикладу 23.

NaH (60% в мінеральному маслі) суспендували в 100мл сухого ТГФ, його перемішували і охолоджували до 0°C під N_2 протягом 10хв і потім додавали (2S,5S)-(+)-2,5-гександіол (12г в 120мл сухого ТГФ). Діол додавали по краплям через крапельну воронку протягом 30хв., цю суміш перемішували при 0°C протягом 60хв, потім КТ 30хв., охолоджували до 0°C і додавали 4-фтор-2-(трифторметил)бензонітрил (20г в 80мл сухого ТГФ) протягом 30хв. Реакцію перемішували при 0°C до КТ під N_2 (11.00-9.00 наступного дня). Реакцію контролювали за допомогою ТШХ (Гекс:Етилацетат = 1:1) і РХ/МС.

Очищення: Неочищений продукт розчиняли в 80мл суміші розчинників (гексан:етилацетат = 3:1), очищали за допомогою колонки використовуючи гексан:етилацетат = 5:1 до 1:1, як елюент, одержуючи 22г чистого бажаного продукту.

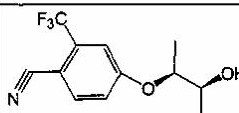
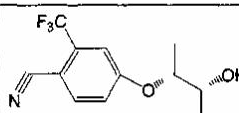
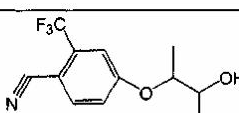
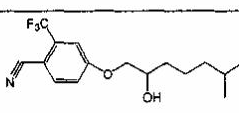
Приклад 32

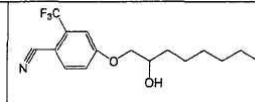
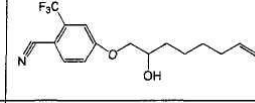
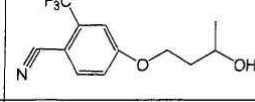
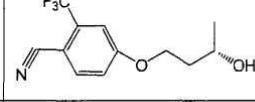
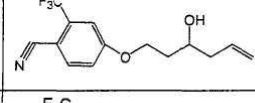
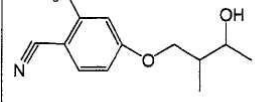
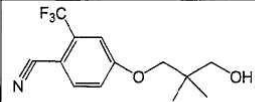
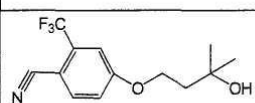
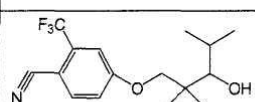
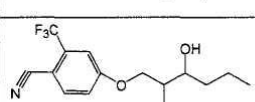
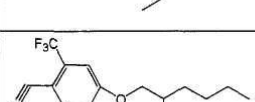
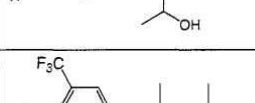
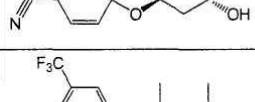
Сполуки формули I мають спорідненість до андрогенового рецептора. Ця спорідненість демонструється для певних сполук використовуючи рецептор людини Далі приводиться опис, як проводили дослідження.

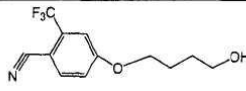
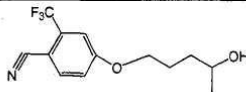
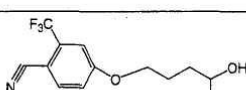

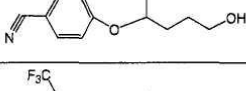
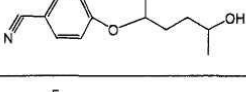
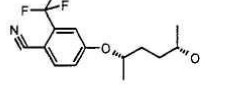
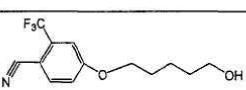
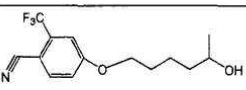
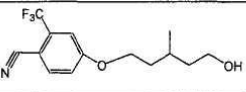
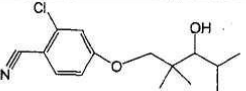
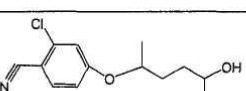


Аналіз конкурентного зв'язування проводили в екстрактах бакуловірус/3ї9, що генерують hAR (андрогеновий рецептор людини) в присутності або відсутності різних концентрацій тестуємого агенту і фіксованої концентрації ^3H -дигідротестостерону (^3H -DHT) як індикатор. Цей спосіб дослідження зв'язування є модифікованим протоколом описаним раніше [Liao S., et. al. J. Steroid Biochem. 20:11-17 1984]. Коротко, концентрації сполук, що поступово зменшуються,

інкубують в присутності hAR екстракту [Chang et al. P.N.A.S. Vol.89, pp.5546-5950, 1992], гідроксиапатиту і 1 нМ ^3H -DHT протягом однієї години при 4°C. Потім, реакції зв'язування промивали три рази до повного видалення надлишку незв'язаного ^3H -DHT. Визначали рівні зв'язування hAR ^3H -DHT в присутності сполуки (= тобто, конкурентне зв'язування) і порівнювали з рівнями зв'язування, коли відсутній конкурент (= тобто, максимальне зв'язування). Спорідненість зв'язування сполуки з hAR виражали як концентрацію сполуки, при якій максимум зв'язування інгібується наполовину. В Таблиці II, нижче, приведені результати, що були одержані для певних сполук (приведені дані є середнім значенням ряду тестів, як показано нижче)

Таблиця II

Приклад №	Структура	Зв'язування AP IC ₅₀ (нМ)
1		351 (в)
2		501 (в)
3		66 (б)
4		442 (а)

5		32 (а)
6		415 (а)
7		274 (а)
8		213 (а)
9		268 (а)
10		70 (а)
11		706 (а)
12		27 (а)
13		442 (а)
14		260 (б)
15		210 (а)
16		6 (а)
17		107 (а)

18		74 (a)
19		505 (a)
20		243 (a)
21		808 (a)
22		185 (a)
23		41 (в)
24		632 (в)
25		504 (a)
26		777 (a)
27		63 (в)
28		49 (a)
29		394 (a)
30		99 (a)
31		156 (a)

а – значення двох тестів

б – значення трьох тестів

в – значення чотирьох тестів

Приклад 33

Визначали здатність сполук антагонізувати дію андрогену на андрогеновий рецептор в повному клітинному дослідженні, як описано далі.

Експериментальна процедура клітинного дослідження антагоністу AP

Лінія клітин: MDA-MB453-MMTV клон 54-19. Ця клітинна лінія є стабільно трансфікованою клітинною лінією з MDA-MB453 фоновими клітинами (клітинна лінія пухлини грудей людини, що експресує андрогеновий рецептор). Спочатку був клонований MMTV мінімальний промотор, що містить ARE, перед репортерним геном люциферази світляка. Потім був клонований каскад в трансфекційний вектор pUV120prго. Електропорація була використана для трансфекування MDA-MB-453 клітин. Були відібрані клітинну лінію із стабільною резистентністю до піроміцину.

Клітинне культуральне середовище і реагенти:

Культуральне середовище: DMEM (високий вміст глюкози, Gibco кат №11960-044), 10% CET, і 1% L-глутамін.

Планшетне середовище: DMEM (фенол червоний вільний), 10% вугілля оброблене HyClone сироваткою, 1% L-глутамін.

Середовище дослідження: DMEM (фенол червоний вільний), 1% вугілля оброблене HyClone сироваткою, 1% L-глутамін, і 1% пеніцилін/стрептоміцин.

3× буфер люциферази: 2% бета-меркаптоетанол, 0,6% АТФ, 0,0135% люциферин в клітинному лізисному буфері.

Методика дослідження:

1. Клітини витримують в культуральному середовищі, розділюють клітини, коли вони досягають 80-90% злиття.

2. Тестуємі сполуки, 10000 клітин/лунку поміщають на непрозорі 96 лункові культуральні планшети в 100мкл/лунку середовища, культуру витримують протягом ночі при 37°C в інкубаторі клітинної культури.

3. Обережно видаляють планшетне середовище, тоді додають 80мкл/лунку попередньо нагрітого середовища дослідження, додають 10мкл/лунку сполуки, що тестується (кінцева концентрація) 1000nM, 200nM, 40nM, 8nM, 1,6nM і 0,32nM), інкубують при 37°C протягом 30 хвилин.

4. Додають 10мкл/лунку свіжоодержаного DHT (кінцева концентрація 100pM) до кожної лунки, інкубують при 37°C протягом 17г (протягом ночі).

5. Додають 50мкл/лунку 3× буферу люциферази, інкубують при кімнатній температурі протягом 5 хвилин, потім підраховують на Люмінометрі.

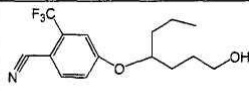
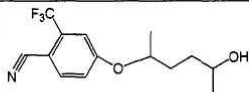
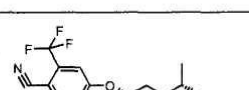




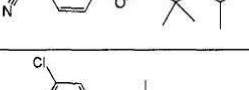
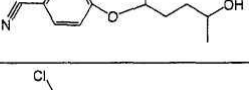
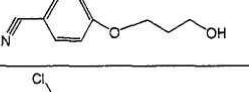
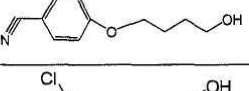
Кратність індукування над фоном 100pM DHT у відсутності сполук, що тестуються, стандартизували під 100% і експериментальні результати виражали як відсоток інгібування сполук, що тестуються.

Результати приводяться нижче в Таблиці III. Результати виражаються як середнє значення декількох тестів, як описано нижче (кількість тестів указується в виносі). N.D. означає, що сполуку не тестували.

Таблиця III

Приклад №	Структура	АР клітини IC ₅₀ (нМ)
1		N.D.
2		N.D.
3		>1000 (a)
4		>1000 (a)
5		509 (a)
6		662 (a)
7		>1000 (b)
8		>1000 (a)

9		N D
10		274 (a)
11		N D
12		269 (a)
13		N D
14		794 (a)
15		124 (a)
16		>1000 (a)
17		807 (a)
18		398 (a)
19		>1000 (a)
20		498 (a)

21		N.D.
22		>1000 (a)
23		132 (N=10)
24		>1000 (a)
25		838 (N=1)
26		N.D.
27		0,04 (a)
28		263 (a)
29		N.D.
30		N.D.
31		N.D.

a – значення двох тестів

б – значення трьох тестів

в – значення чотирьох тестів

Приклад 34

Тваринна модель андрогенової алопеїдії

Як описано вище, алопеція є проблемою, якій медицина присвячує значну увагу. Як з будь-яким захворюванням, дослідниками розроблюються тваринні моделі для дослідження сполук для визначення їх відносної ефективності. Сполуки, що проявляють найвищу ефективність в цих тваринних моделях використовуються в наступних дослідженнях на людях. Були розроблені дві різні тваринні моделі для дослідження алопеції. Першою є дослідження перетворення телогену, яке використовує самиць СЗН/НеН мишей. Друга модель використовує безхвостих макак, які є мавпами, що страждають від андрогенної алопеції.

Дослідження зміни телогену вимірює активність сполуки по перетворенню стадії покою циклу росту волосся ("телоген") у активну стадію циклу росту волосся ("анаген") у мишей. Це дослідження надає таку перевагу, що хутро (тобто, волосся) 7-тижневих СЗН/НеН мишей знаходиться в фазі телогену. Ця фаза продовжується приблизно до віку в 75 днів і цьому дослідженні, у мишей зривають певні області, їх обробляють агентом, що тестується, або контрольним агентом, і вимірюють різницю в швидкості росту волосся (тобто, індукування фази анагену). Першою ознакою анагену є потемніння кольору шкіри обумовлене синтезом меланіну меланоцитами у фолікулах, при підготовці продукування пігментованого волосся. Ця модель має ряд переваг, серед яких слід згадати, доступність самиць СЗН/НеН мишей, придатність для швидкого скринінгу великої кількості сполук і легкість утримування і маніпулювання з такими тваринами.

Найпершою перевагою цієї моделі є її подібність до андрогенетичної залежності. В той час як точна причина облісіння людей не відома, добре відомо, що андрогени індукують регресію фолікул волосся на шкірі голови. Ця постадолюсцентна регресивна зміна є фундаментальною причиною облісіння у чоловіків, (тобто, андрогенетична алопеція). Цей феномен зустрічається у чоловіків і жінок, які мають успадковану генетичну алопецію, як було згадано раніше. Для більш детального ознайомлення з дією андрогенів на шкіру голови людей, увага читача звертається на публікацію Trueb, RM, Molecular Mechanisms of Androgenic Alopecia, Exp Gerontology, 2002, 27:981-990.

Дослідники розглянули і інших тварин, що мали подібний до людей ріст волосся. Це привело дослідників до безхвостих макак. Ці примати також страждають на андрогенетичну алопецію. По суті, у всіх постадолюсцентних макак, обох статей, спостерігається розвиток облісіння. Подібно до розвитку облісіння у чоловіків людей, андрогени є обов'язковим ініціюючим фактором облісіння макак. Потоншення волосся на фронтальній частині шкіри голови починається проявлятися протягом того ж самого віку (4 роки), коли рівні тестостерону в сироватці починають радикально підніматись у тварин чоловічої статі. Хоча збільшення рівню тестостерону у жінок складає приблизно одну десяту рівня чоловіків, відсутня відміна між ступенем і віком початку облісіння у самців і самок безхвостих макак. Місцеве застосування анти-андрогенів обертає це облісіння у тварин обох статей [Pan, H J et al, Evaluation of RU58841 as an anti-androgen in prostate PC3 cells i a topical anti-alopecia agent in the bald scalp of stump tailed macaques Endocrine 1998; 9:39-43].

Хоча ця модель є значним покращенням дослідження перетворення телогену, як моделі облісіння людей, вона страждає від ряду практичних недоліків. Макаки є дорогими, відносно рідкими, потребують знаної уваги при догляді і потребують тривалого миття перед тестуванням.

Таким чином, макака не є практичною моделлю для дослідження великої кількості сполук.

Було відкрито, що самці C3H/HeN мишей можуть бути використані в дослідженні перетворення телогену, коли оцінюються анти-андрогенові сполуки. Таким чином, модель стосується модифікації наявного дослідження перетворення телогену. Використовують самців C3H/HeN мишей приблизно 7 тижневого віку. Ці тварини також постійно знаходяться в фазі телогену, подібно до їх самиць. Однак, один раз побриті, андрогени присутні в цих самцях мишей інгібують перетворення фолікул волосся у фазу анагену. Анти-андрогену будуть блокувати цю андрогенетичну дію і фолікули будуть перетворюватись у анаген, подібно до їх копій жіночої статі.

Приклад 34A

Сполука описана в Прикладі 23, (1S,4S)-4-(4-Гідрокси-1-метилпентилокси)-2-трифторметилбензонітрил була запропонована для подальших дослідів використовуючи модифіковане дослідження перетворення телогену, описане вище. Тестування проводили наступним чином.

В цьому дослідженні використовували самців C3H/HeN мишей, віком 6-7 тижнів [Charles River Laboratories, Raleigh, NC] Хутро обрізали ножицями на спині мишей перед початком дослідження. Для включення в дослідження відбирали тільки мишей з рожевою шкірою, візуально індукується фаза телогену.

Сполуку, що тестується, розчиняли у розчиннику, що містить пропіленгліколь (30%) і етанол (70%) одержуючи концентрацію або 0,2% в/о, 0,5% в/о, 1% в/о або 3% в/о. Релевантну дозу наносили місцево на вистрижену спинну область мишей в першій групі, що тестується (7-10 мишей) в об'ємі 20мкл/см². Третя група тварин одержували тільки розчинник і використовувалась як контрольна. Лікування проводили двічі на день протягом 4 тижнів.

Оброблену область аналізували і оцінювали кожен наступний день на ознаки росту волосся. Ріст волосся вимірювали і занотовували, для кожної тварини, з дня на який з'явилися перші ознаки росту волосся на оброблюваній поверхні. Першою ознакою анагена було потемніння кольору шкіри внаслідок початку синтезу меланіну меланоцитами у фолікулах, при підготовці продукування пігментованого волосся. Мишей спостерігали протягом 35 днів або довше. Відсоток мишей, що мають ознаки росту волосся і в групі, що лікувались, і контрольній групі, графічно представлений нижче на Фіг.1. Сполука Прикладу 23, коли тестувалась в концентрації 1%, викликала значний ріст волосся через стимулювання індукування анагену у тестуємих тварин. Швидкість росту волосся у 5% тестуємої групи не перевищувала значення контрольної групи, що обробляли розчинником.

Приклад 34B

Продукт Прикладу 27, 2-хлор-4-(3-гідрокси-2,2,4-триметилпентилокси)бензонітрил, передавали на тестування використовуючи

модифікований дослід перетворення телогену, описаний вище. Тестування проводили тим же самим чином як і Приклад 37A, концентрація тестування 3% в/о. Швидкість росту волосся для тестованої групи, не перевищувала значення контрольної групи.

Приклад 35

Тваринна модель інгібування продукування шкірного сала

Luderschmidt et al описують тваринну модель для тестування здатності сполук модулювання секретування шкірного сала. Arch. Derm. Res. 258, 185-191 (1977). В цій моделі використовуються самці сірійських хом'яків, вуха яких містять сальні залози. В цьому дослідженні використовували деякі сполуки одержані вище.

Тестування по інгібуванню шкірного сала проводили наступним чином. Самців сірійських хом'яків віком 9-10 тижнів поміщали в лабораторні умови і акліматизували протягом 2 тижнів перед дослідженням. Кожна група складається з 5 тварин і проводили паралельне дослідження з розчинником і позитивним контролем. Перед використанням, 30мг кожної сполуки розчиняли в 1мл універсального розчинника(етанол/пропіленгліколь (70/30%об/об) одержуючи кінцеву концентрацію 3в/о%.

Сполуку тваринам наносили місцево двічі на день, п'ять днів на тиждень, протягом 4 тижнів. Кожна доза містить 25 мікролітрів контрольного розчинника або активного агенту. Дози наносили на вентральні поверхні правого і лівого вуха. Всіх тварин умертвляли приблизно через 18-24 годин після останньої дози. Збирали праві вуха кожної тварини і використовували для аналізу шкірного сала.

Вуха піддавали ВЕРХ аналізу наступним чином. Відбирали один 8 мм дистальний біопсійний прокол, тільки вище анатомічної "V" позначки в усі для нормалізації площини зразка. Прокол витягали окремо. Вентральну біопсійну поверхню (площина, на яку безпосередньо наносилась місцева доза) зберігали для тестування і дорсальну поверхню біопсійного проколу відкидали.

Зразки тканини промивали N₂ і зберігали при -80°C під азотом до ВЕРХ аналізу. На додаток до кожного з вушних зразків, також зберігали аліквоту кожного активного агенту і розчинника (принаймні, 250мкл) при -80°C протягом введення в ВЕРХ аналіз.

ВЕРХ аналіз проводили на екстракті зразка тканини. Зразки тканини вводили у контакт з 3мл розчинника (4:1 суміш 2,2,4-триметилпентану і ізопропілового спирту). Суміш збовтували протягом 15 хвилин і зберігали протягом ночі при кімнатній температурі, в захищеному від світла місці. На наступний ранок до зразкам додавали 1 мілілітр води і збовтували протягом 15 хвилин. Зразок центрифугували приблизно при 1500об/хв протягом 15 хвилин. Два мл органічної фази (верхній шар) переносили в скляну колбу, сушили при 37°C, в атмосфері азоту, протягом приблизно 1 години, і потім ліофілізували протягом приблизно 48 годин. Зразки видалляли з

ліофілізатора і кожну колбу відновлювали 600мкл розчинника А (триметилпентан/тетрагідрофуран (99:1). Зразки закривали і збовтували протягом 5 хвилин.

200мкл кожного зразка переносили в попередньо марковану 200мкл ВЕРХ колбочку з 200мкл скляні втулки. ВЕРХ колби поміщали в автосамплер лотка пристрою Agilent 1100 серії ВЕРХ. Agilent 1100 ВЕРХ система включає термостатичний автосамплер, кватерний насос, колонковий нагрівач і А/D інтерфейсний модуль. Всі компоненти контролювалися з використанням програмного забезпечення Agilent ChemStation. Аналітичну колонку Waters Spherisorb S3W 4,6×100мм витримували при 30°C використовуючи нагрівач колонок Agilent. ВЕРХ автосамплер запрограмовували для підтримання температури зразка 20°C протягом всього пропускання крізь колонку.

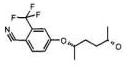
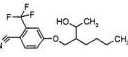
10мкл кожного зразка ін'єктували тричі в колонку. Для створення градієнту розчинників використовували два розчинники. Розчинником А була суміш триметилпентану і тетрагідрофурану (99:1). Розчинником В був етилацетат. Градієнт використовували як описано в наступній таблиці:

Час (хв)	Розч А (%)	Розч В (%)	Потік (мл/хв)
0	99	1	2
2	96	4	2
6	60	40	2
7	5	95	2
10	5	95	2
10,1	99	1	2

Sedex 75 Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) працював при 45°C з приростом 5 і тиском N₂ 3,1бар Одержаний з використанням пристрою аналоговий сигнал направляли до програмного модулю Agilent A/D, де він перетворювався у цифровий. Перетворення базувалось на 10000мАО/вольт на точку і швидкість даних була 10Гц (0,03хв). Одержаний цифровий сигнал подавали до програми Agilent ChemStation для інтегрування площини піка

Результати ВЕРХ аналізу приведені нижче в Таблиці IV. Результати приведені як зменшення продукування холестеролового естеру (СЕ) і естеру воску (WE), порівняно з контрольним розчинником

Таблиця IV

Сполука	Структура	% Зменшення СЕ	% Зменшення WE	Сума СЕ+WE
Приклад 23		67%	87%	154%
Приклад 15		54%	74%	128%

Колонки 1 і 2 ідентифікують сполуку через структуру і номер прикладу. Колонки 3 -5 показують дію сполук по зменшенню компонентів шкірного сала (СЕ і WE). Результати виражають як

різницю з контрольним розчинником. Позитивне значення відображає зменшення продукування вимірюваних компонентів шкірного сала, тобто холестеролового естеру (СЕ) або естеру воску (WE).

Колонка 3 показує, що сполуки здатні зменшувати кількість холестеролового естеру в зразку шкірного сала. Column 4 показує дію сполуки на генерування естеру воску. Естер воску є специфічними маркерами сальних залоз і в значній мірі не детектуються в будь-якому іншому шарі шкіри. Естер воску є найголовнішим компонентом шкірного сала (приблизно 25%). Таким чином, зменшення естеру воску типово призводить до значного зменшення секретування шкірного сала. В колонці 5 підсумовані результати виражені в колонках 3 і 4 (і включені для подальшого пояснення відносних відмінностей в активності). Як показано в Таблиці IV, андрогенові модулятори формули I значно зменшують продукування і холестеролового естеру і естеру воску.

